Ueber den Einfluss oberflächenaktiver Stoffe auf die Diffusion in Gelatine

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Universität Basel

vorgelegt von

Ladislaus Laszt

aus Oradea (Rumänien)

ORADEA 1934

Druck von Wilhelm Rubinstein.

Ueber den Einfluss oberflächenaktiver Stoffe auf die Diffusion in Gelatine

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Universität Basel

vorgelegt von

Ladislaus Laszt

aus Oradea (Rumänien)

ORADEA 1934

Druck von Wilhelm Rubinstein.

Von der medizinischen Fakultät genehmigt auf Antrag von Herrn Professor Dr. F. Verzár.
Tag der Promotion: 13. Juni 1934.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Die Stoffaufnahme und Stoffwanderung im lebenden Organismus wird bekanntlich weitgehend von *Diffusionsvorgängen* beherrscht. Die Geschwindigkeit, mit der ein (molekular- oder kolloiddispers) gelöster Stoff sich in dem Lösungsmittel ausbreitet, d. h. diffundiert, hängt in erster Linie von der Teilchengrösse der gelösten Substanz und von dem in der Lösung für diese Substanz herrschenden Konzentrationsgefälle ab. Weiter spielen die spezielle Natur des (homogenen) Lösungsmittels, z. B. im Hinblick auf Viskosität, Solvatation u. s. w., sowie Temperatur und Konzentration des gelösten Körpers eine Rolle. Unter Beachtung aller dieser Faktoren gelangt man bei der theoretischen Behandlung der Diffusionserscheinungen zu einer den Diffusionsvorgang bestimmenden und charakteristischen Grösse, dem sogenannten *Diffusionskoeffizienten*. Mit dieser Grösse ist die Diffusionsgeschwindigkeit eines Stoffes in einem Lösungsmittel festgelegt.

Versuchen wir aber, die uns von wohldefinierten Lösungen bekannten Diffusionserscheinungen auch in biologischem Milieu wiederzufinden, so stossen wir auf zahlreiche Schwierigkeiten, die bei oberflächlicher Betrachtung die Diffussionsgesetze im biologischen Objekt als nicht völlig gültig erscheinen lassen. Tatsächlich sind wir auch heute noch nicht in der Lage, alle Erscheinungen des Stofftransportes im Körper auf die physikalischen Gesetze der Diffusion zurückzuführen. Das beruht darauf, dass im Organismus noch andere Affinitäten wirksam sind, die den Stoffaustausch zwischen den Zellen, dem Blut und den Gewebssäften regulieren. Vor allem ist an das Vorhandensein von *Membranen* zu denken, die den Diffusionsvorgang im biologischen Objekt komplizierend beeinflussen. Einmal verringern die Membrane den Diffusionsquerschnitt; je nach ihrer Porenweite (Ultrafiltertheorie) und ihrem stofflichen Aufbau (Lipoidtheorie) sind sie

häufig sogar nur streng elektiv für bestimmte Substanzen durchlässig. Ferner sind an und in den Membranen noch spezielle Affinitäten, beispielsweise chemische, adsorptive und elektrostatische wirksam, deren Unkenntnis die Stoffaufnahme und den Stoffaustausch häufig als einen „vitalen" Prozess erscheinen liess. Hier sei schon angedeutet, dass der Membranzustand und damit ihre *Permeabilität* durch zahlreiche Bedingungen schon physiologischerweise beeinflusst werden kann, so durch Reaktionsänderung, Elektrolyte, Aenderung des Quellungszustandes usw.

Eine weitere Erscheinung, die den Diffusionsvorgang im biologischen Objekt auf den ersten Blick unübersichtlich gestaltet, tritt mit der verbreiteten Tatsache der gegenseitigen Beeinflussung von *Lösungsgenossen* hervor. Gerade in dem so kompliziert aufgebauten biologischen Milieu ist hierzu die Möglichkeit in ausgezeichnetem Grade gegeben. Dass schon die Anwesenheit allein von indifferenten Lösungsgenossen die Diffusion eines Stoffes beeinflussen kann, konnten im Modellversuch *Freundlich* und *Krüger* [1]) zeigen, die für Chinon, Hydrochinon und Harnstoff in Elektrolytlösungen andere Dispersitätsverhältnisse fanden als in reinen Lösungen. Den Einfluss von Verunreinigungen auf die Diffusion von Farbstoffen hebt auch *A. Nistler* [2]) hervor, was im Hinblick auf die ausgedehnte Verwendung von Farbstoffen im biologischen Versuch von grossem Interesse ist.

Besonders eine Klasse von Stoffen, nämlich die durch ihre Kapillaraktivität gekennzeichneten Substanzen, verdienen im Hinblick auf ihr ausgeprägtes Vermögen, Diffusionsvorgänge zu beeinflussen, die Aufmerksamkeit des Biologen. Im Organismus ist diese Körperklasse ausserordentlich verbreitet; es seien hierbei nur die Gallensäuren, Fettsäuren, Eiweisse, Lipoide genannt, die sämtlich die Eigenschaft haben, in ihren Lösungen die Oberflächenspannung des Lösungsmittels zu erniedrigen. Das kapillaraktive Verhalten mancher Stoffe ist häufig in Parallele zu ihrer biologischen Wirkung gebracht worden; hier sei nur auf die Oberflächenspannungstheorie der Narkose hingewiesen, die bekanntlich von *J. Traube* [3]) ausgebildet wurde. Die Erscheinung, dass oberflächenaktive Substanzen bestimmte Stoffe in ihrer Diffusion zu beeinflussen vermögen, beruht mehr auf sekundären Vorgängen. Einmal sind, wie ich noch ausführen werde, die

oberflächenaktiven Stoffe in hervorragender Weise dazu in der Lage, auf zahlreiche andere in der Lösung befindliche Substanzen einzuwirken und dadurch deren Ausbreitung im Diffusionsgefälle zu beeinflussen. Dann ist eine Einwirkung der oberflächenaktiven Stoffe auf die Zellmembran in Betracht zu ziehen, die ebenfalls den Durchtritt von Substanzen durch diese Membran beeinflussen kann.

Ein Beispiel mag die Wirkung eines oberflächenaktiven Stoffes deutlich machen. Wird eine Suspension von entfettetem Russ durch ein Papierfilter gegossen, so läuft ein klares Filtrat ab, während der Russ auf dem Filter zurückbleibt. Setzt man jedoch der Russ-Suspension eine oberflächenaktive Substanz z. B. Seife zu, so gehen auch die Russteilchen mit durch das Filter. Eine Erklärung für diese Erscheinung ist in einer grundlegend wichtigen Eigenschaft der oberflächenaktiven Stoffe zu suchen; nämlich in ihrer leichten Adsorbierbarkeit. In dem angeführten Beispiel werden die stark oberflächenaktiven Seifenmicellen leichter an die Zellulose adsorbiert als die Russteilchen, infolgedessen kommt es bei den letzteren bei Gegenwart von Seife zu keiner adsorptiven Haftung an die Zellulose. Ebenso ist aber auch folgende Möglichkeit in Betracht zu ziehen: infolge ihrer Kapillaraktivität reichern sich die Seifenteilchen an den Phasengrenzen Russteilchen Wasser an und umhüllen die Russteilchen: die Seife wirkt als „Schutzkolloid" und verändert dadurch die für die Erhaltung von Adsorptionsaffinitäten ausschlaggebende „Fassade" der Russteilchen.

Mit ähnlichen Vorgängen wie dem in diesem Beispiel geschilderten haben wir es auch häufig in der Biologie zu tun. So fanden *Brinkmann* und *Szent-Györgyi* [4]), dass eine Kollodiummembran, die für Hämoglobin undurchlässig ist, durch Behandlung mit Natriumglykocholat oder Natriumcholat dafür permeabel wird. Das zeigt, dass die *Diffusionsfähigkeit* des Hämoglobins durch Kollodiummembrane abhängig ist von der Anwesenheit oberflächenaktiver Stoffe; andererseits kann man auch sagen, dass die Permeabilität der Kollodiummembran eine verschiedene ist, je nach dem, ob eine kapillaraktive Substanz anwesend ist oder nicht.

In ähnlicher Richtung weisen folgende Versuchsergebnisse: *Traube* und *Siar-Hong Whang* [5]) fanden, dass die Ausflussgeschwindigkeiten von Flüssigkeiten in Kapillaren beschleunigt werden, wenn die innere Wand des Lumens mit einem oberflächenaktiven Stoff überzogen wird. *Traube* zieht zur Erklärung dieser Erscheinung die veränderte Grenzflächenspannung zwischen Kapillarwand und diffundierender Lösung heran. Bekannt ist die Tatsache, dass Lösungen kapillaraktiver Stoffe in Kapillaren leichter ansteigen; *Weber* und *Neugebauer* [6]) zeigten, dass die Schnelligkeit des Ansteigens proportional der Oberflächenaktivität der Lösungen geht.

Von besonderem Interesse ist die von *C. Neuberg* [7]) beschriebene *Hydrotropie*. Hydrotrop, d. h. löslichkeitssteigernd für bestimmte in Wasser schwer- oder unlösliche Substanzen wirken zahlreiche oberflächenaktive Stoffe, so z. B. die polar gebauten Salze organischer Sulfonsäuren. *Neuberg* denkt dabei an die Bildung von Komplexverbindungen zwischen dem hydrotrop wirkenden Körper und der schwer löslichen Substanz.

Diese Tatsache der Hydrotropie ist auch physiologisch von grossem Interesse, da wir auch im Organismus mit den Vorhandensein solcher hydrotrop wirkender Substanzen zu rechnen haben. Mit einer Löslichkeitssteigerung ist in der Regel auch eine erhöhte Aufnehmbarkeit des Stoffes durch den Organismus verbunden.

Die Bedeutung der Hydrotropie für Diffusions- und Resorptionsvorgänge der Fette wurde in mehreren Arbeiten von *Verzár* und *Kúthy* ausführlich untersucht und festgestellt, dass Fettsäuren durch die Wirkung hydrotroper Substanzen wasserlöslich und diffusibel werden, eine Wirkung, die vom pH des Milieus abhängig ist. Ausgehend von *Kochmann* und *Anselmino's* [8]) Beobachtung, das Stoffe, je nach dem, ob sie quellend oder entquellend auf die Gelatine wirken, die Diffusion in Gelatine beschleunigen oder hemmen, untersuchte *Kúthy* [9]) ebenfals in letzter Zeit den Einfluss oberflächenaktiver Substanzen, sowohl auf die Quellung als auch auf die Diffusion von Substanzen in Gelatine. Er fand bei einer Reihe oberflächenaktiver Stoffe, nämlich den hydrotropen Substanzen von *Neuberg*, eine quellungsfördernde und zugleich eine permeabilitätssteigernde Eigenschaft.

Eigene Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, welchen Einfluss oberflächenaktive Stoffe auf die Diffusion verschiedener Substanzen in Gelatine haben. Nach den bereits vorliegenden Untersuchungen über diese Frage kann der Einfluss oberflächenaktiver Stoffe auf die Diffusion vor allem nach 3 Richtungen erklärt werden. Einmal ist an eine Beeinflussung der Grenzflächenspannung als hemmender oder beschleunigender Faktor für die Diffusion zu denken, wie es in den erwähnten Versuchen von *Traube* und *Siar-Hong Whang* zum Ausdruck kommt. Dann kommt eine Beeinflussung der Löslichkeit der diffundierenden Stoffe in Betracht, wie wir diese in der Neuberg'schen Hydrotropie ausgeprägt finden. Endlich ist eine direkte Wirkung der oberflächenaktiven Stoffe auf die Membran ins Auge zu fassen; hier sind vor allem Adsorptions-, Quellungs- und Entquellungserscheinungen in Betracht zu ziehen.

Aus diesen Angaben schon kann man ersehen, dass bei der Diffusionsbeeinflussung durch oberflächenaktive Stoffe verschiedene Faktoren in Betracht kommen. Es wird nicht immer zu entscheiden sein, welche von diesen Faktoren von massgebender Wirkung sein werden. Es ist auch daran zu denken, dass neben einer Löslichkeitserhöhung auch eine Löslichkeitserniedrigung durch oberflächenaktive Stoffe vorhanden sein kann. Dasselbe gilt für eine dispersitätserhöhende oder vermindernde Wirkung der oberflächenaktiven Stoffe. Im ersteren Fall ist eine Diffusionsbeschleunigung die Folge, im letzteren dagegen eine Hemmung.

Ich habe nun versucht, ausser an *Lipoiden* an einer Reihe von *Farbstoffen* den Einfluss oberflächenaktiver Stoffe auf die Diffusion in Gelatine festzustellen. Es konnte daran gedacht werden, dass bei der Verschiedenartigkeit der untersuchten Farbstoffe sich der Einfluss der oberflächenaktiven Stoffe auf die Diffusion dieser Farbstoffe in verschiedener Weise äussert. Zu diesem Zwecke habe ich zwei stark oberflächenaktive Stoffe gewählt, nämlich Natriumglykocholat, da dieses als gallensaures Salz bei der Resorption vor allem von Fetten eine erhebliche Rolle spielt, ferner Saponin. Es wurden isokapillare Lösungen angewandt. Eine 5 %-ige Natriumglykocholatlösung entspricht

einer 0,4 %-igen Saponinlösung, in Phosphatpuffer von ph 6.97 gelöst. Die Oberflächenspannungen dieser Lösungen sind (nach der Ringmethode von Du Nouy 45 dyn.

I. TEIL.

Diffusion von Olivenoel und Oleinsäure in Gelatine.

Es ist oft nachgewiesen worden, dass die Gallensäuren nicht nur auf die Resorption der Fette, sondern auch auf die Resorption von anderen Substanzen eine beschleunigende Wirkung haben. Es scheint deshalb die Möglichkeit vorhanden zu sein, dass die Gallensäuren auch die Fettsäureresorption auf dieselbe Weise beeinflussen, wie die von verschiedenen anderen Substanzen. Gallensäuren sind sehr stark oberflächenaktive Substanzen, andererseits wissen wir aber, dass sie mit den Fettsäuren Komplexverbindungen bilden. Man kann sich deshalb fragen, ob die Wirkung der Gallensäuren auf die Resorption von Fettsäuren auf Grund ihrer Komplexbildung oder auf Grund ihrer Oberflächenaktivität zu erklären ist. In den Arbeiten von *Verzár* und *Küthy* wurde die Komplexbildung als Erklärungsprinzip herangezogen. In verschiedenen Arbeiten haben diese Autoren gezeigt, dass der Komplex Gallensäure — Fettsäure wasserlöslich und diffusibel ist, dass speziell die Komplexe mit gepaarten Gallensäuren gerade bei den im Darm herrschenden Reaktionsverhältnissen stabil sind. Allerdings hat sich auch bei ihren Untersuchungen ergeben, dass in vivo schon so geringe Mengen von gepaarten Gallensäuren Fettsäuren resorbierbar machen, dass eine Komplexbildung allein zur Erklärung nicht genügt. Sie haben deshalb die weitere Erklärung herangezogen, dass die sehr oberflächenaktiven Gallensäuren in der Oberfläche der Schleimhaut zurückgehalten werden und immer neue Fettsäuremengen diffundierbar machen.

Die Frage, ob die Wirkung der Gallensäuren im wesentlichen Oberflächenaktivitätswirkung oder Komplexbildung ist, scheint sich auf die folgende Weise prüfen zu lassen. Wäre nur die Oberflächenaktivität wirksam, so müsste eine Substanz, die dieselbe Oberflächenaktivität hat, dieselbe Wirkung auf die Diffu-

sibilität der Fettsäuren haben. Liegt aber eine Komplexbildung als Ursache vor, dann werden Substanzen, die ebenso oberflächenaktiv, aber von verschiedener chemischer Struktur sind, keine Wirkung auf die Diffusibilität von Fettsäuren haben. Es wurde deshalb im folgenden versucht, ob eine Saponinlösung und eine Lösung von Na-Glykocholat denselben Effekt auf die Diffusibilität von Fettsäuren und Neutralfetten haben.

Die Wirkung von Galle auf die Diffusibilität von Fetten haben schon *Fürth* und *Scholl* untersucht. Sie fanden, dass eine Diffusion von Neutralfett, Olivenoel, in Galle gelöst, in Gelatine möglich ist. Das ist deshalb überraschend, weil die Diffusion durch Schleicher und Schüll'sche Diffusionspergamentmembranen durch Gallensäure nicht möglich ist. Ich muss auch hier hervorheben, dass es auch mir tatsächlich nicht gelungen ist, Neutralfette mit Gallensäuren in Gelatine diffusibel zu machen. Dagegen gelingt es ohne weiteres mit Fettsäuren. Dieser Wiederspruch zwischen den Ergebnissen von *Fürth* und *Scholl* einerseits und meinen Versuchen andererseits ist schwer zu erklären. Die Gelatinelösung ist bei ihnen und bei mir dieselbe gewesen. Der Unterschied besteht darin, dass sie die ganze Galle benützt haben, während ich nur Lösungen von Gallensäuren benützt habe. Es wäre möglich, dass andere Bestandteile der Galle hier noch dispergierend mitwirken, immerhin scheint ihrem Resultat auch in dem Fall, wenn es tatsächlich bestehen würde, kaum eine physiologische Bedeutung zuzukommen, weil die Resorption der Fette ja erwiesenermassen nicht in Form von Neutralfetten, sondern nach Spaltung in Fettsäuren erfolgt.

Methodik. In Reagenzgläser von gleicher Weite wurden 5 ccm von einer 10 %-igen Gelatinelösung, die in Phosphatpuffer von pH 6.97 gelöst wurde, gegeben und bis zum Erstarren stehen gelassen. Nach dem Erstarren wurde die Gelatine mit 4 ccm einer Fettemulsion in Natriumglykocholat bzw. Saponin überschichtet. Die Fettemulsion wurde erhalten, indem 5 ccm Olivenoel in etwa 100 ccm Aether gelöst wurden; 10 ccm der ätherischen Lösung wurden zu 20 ccm 5 % Natriumglykocholat bzw. 0·4 % Saponin in Phosphatpuffer gegeben und geschüttelt. Der Aether wurde durch Abdampfen entfernt. Die Diffusion dauerte 4 Tage im Eisschrank.

Nach Ablauf des Versuches wurde die Fettemulsion abgegossen, die Gelatineoberfläche gut mit verdünntem Alkohol und destilliertem Wasser abgespült. Dann wurden 5 ccm normale Salzsäure zugesetzt und 2 Stunden auf dem Wasserbad hydrolisiert. Nach Abkühlung wurde bei alkalischer Reaktion 4-mal 5 Minuten lang wiederholt mit Aether ausgeschüttelt. Der Aetherextract wurde mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert, der Aether abdestilliert und der Rückstand bis zur Gewichtskonstanz bei 60—70° getrocknet und gewogen. Als Kontrolle dienten Versuche, in denen Gelatine und Natriumglykocholat ebenfalls mit Aether ausgeschüttelt und der Rückstand des Aetherextraktes bestimmt wurde.

1. Diffusion von Neutralfetten.

Tabelle I.

Diffusion von Olivenoel mit Na-Glykocholat und Saponin in Gelatine.

Versuch Nr.	Versuch dauer	Diffundiert mit Na-Glykocholat		Diffundiert mit Saponin	
		Aetherextract b. Olivenoel-versuch	Aetherextract b. Kontroll-versuch ohne Olivenoel	Aetherextract b Olivenoel-versuch	Aetherextract b. Kontroll-versuch ohne Olivenoel
		mg	mg	mg	mg
1a	5 Tage	10,0	10,2	9,7	9,6
1b	5 »	9,2	9,8	9,0	9,7
2	5 »	9,8	9,5	10,0	
3a	5 »	8,9			
3b	5 »	10,0			
	Mittel:	9,5	9,8	9,6	9,65

Es zeigt sich, dass der auf die beschriebene Weise gewonnene Aetherextrakt, sowohl in den Diffusionsversuchen, in denen über die Gelatine die Fettemulsion geschichtet war, der gleiche ist, wie bei den Kontrollversuchen. Das bedeutet, dass aus der Olivenoelemulsion sowohl mit Natriumglykocholat, als auch mit Saponin kein Fett in die Gelatine diffundiert. Dieses Resultat kann nach den in der Resorptionsforschung vielfach gemachten Erfahrungen nicht besonders überraschen, da wir wissen, dass erst die freien Fettsäuren mit Gallensäuren reaktionsfähig sind, und so zur Resorption gelangen.

2. Diffusion von Fettsäuren.

In dem folgenden Versuch habe ich die Diffusibilität von Oleinsäure unter dem Einfluss von Natriumglykocholat bzw. Saponin untersucht. Der Diffusionsversuch erfolgte in gleicher Weise, wie oben. Die Diffusionszeit betrug jedoch 48 Stunden und erfolgte bei Zimmertemperatur. Die Aetherausschüttelung des Dialysates geschah bei saurer Reaktion. Im Aetherrückstand wird in den Versuchen mit Gallensäure neben eventuell diffundierenden Oelsäuremengen auch Gallensäure gefunden, die gesondert stufenphotometrisch nach der Methode von *Süllmann* und *Schaub* [10]) bestimmt wurde. Ausserdem gibt Gelatine selbst etwas Aetherrückstand. Ein Kontroll-Versuch wurde deshalb jeweils mit Na-Glykocholat bzw. Saponin allein aufgestellt. Die Menge des Gesamtaetherextraktes der Kontrollversuche (Mittel der beiden Kontrollversuche der Tab. II.) wurde vom Gesamtaetherextrakt der Versuche mit Oleinsäure abgezogen und ergibt die Menge der „diffundierten Oleinsäure". Tabelle II. zeigt die Resultate.

Tabelle II.

Diffusion von Oleinsäure mit Na- Glykocholat und Saponin in Gelatine.

		Diffundiert mit Na- Glykocholat					Diffundiert mit Saponin		
				Kontroll-versuch					
Versuch Nr.	Versuchsdauer St	Gesamt-aether-extract mg	Na-Glyko-cholat mg	Gesamt-aether extract mg	Na-Glyko-cholat mg	Diffundierte Oleinsäure mg	Gesamt-Aether-extract mg	Kontroll-versuch Gesamt-aether-extract mg	Diffundierte Oleinsäure mg
4	48	40,3	32,5	35,6	32,5	4,2	3,5	3,5	0
5	48	41,1	31,3	36,7	32,8	5,0	3,6	3,3	0
6	48	41,5	33,2			5,4	3,4		0

Es ergibt sich, dass Oleinsäure mit Gallensäure tatsächlich diffusibel wird während Saponin ohne Einfluss auf die Diffusibilität der Fettsäuren ist. Die Erhöhung der Löslichkeit höherer Fettsäuren durch Gallensäure ist aus einer Reihe von Untersuchungen bekannt. (*Wieland* und *Sorge* [11]) und *Verzár* und *Kúthy* [12]). Es war aber noch von Interesse, den Einfluss von Saponin weiter zu untersuchen.

3. Löslichkeitsbestimmungen.

Gleichzeitig habe ich auch noch quantitative Löslichkeitsbestimmungen von Fettsäuren in Gallensäure bzw. Saponinlösungen gemacht, um so die mit Saponin erhaltenen Daten zu denen mit Gallensäure in Beziehung setzen zu können.

In Zentrifugengläsern wurden 60 mg Stearinsäure eingewogen und 20 ccm 0 5 bzw. 5%-ige gepufferte Natriumglykocholatlösung oder 0,4 bzw. 5 %-ige gepufferte Saponinlösung zugegeben. Nachher wurde im Schüttelapparat 16 Minuten geschüttelt, abzentrifugiert, filtriert, der Rückstand in Alkohol gelöst, und gegen Phenolphtalein mit n/10 NaOH titriert. Die Löslichkeit wurde bei 18 und 45° C bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle III. zusammengestellt.

Tabelle III.

Löslichkeitsbestimmungen von Stearinsäure mit Na-Glykocholat u. Saponin.

Versuch No.	Eingewogene Stearinsäure mg	Zugesetzte Na-Glykocholatmenge	Zugesetzte Saponinmenge	Gelöst in mg mit Na-Glykocholat bei 18°C	Gelöst in mg mit Na-Glykocholat bei 45°C	Gelöst in mg mit Saponin bei 18°C	Gelöst in mg mit Saponin bei 45°
7a	60	20 cm³ 5%	20 cm³ 0,4%	18,8	32,3	0,3	0,3
7b	60	20 cm³ 5%	20 cm³ 0,4%	19,2	32,3	0,3	0,3
8a	60	20 cm³ 0,5%	20 cm³ 5%		14,5		2,2
8b	60	20 cm³ 0,5%	20 cm³ 5%		14,5		2,2

Aus diesen Zahlen ergibt sich, dass Natriumglykocholat die Fettsäuren in beträchtlichem Masse in Lösung bringt, wie das schon *Verzár* und *Kúthy* gezeigt haben, während mit Saponin nur Spuren gelöst wurden. Die Resultate stimmen mit denen aus den Diffusionsversuchen mit Gallensäure, bzw. mit Saponin überein, d. h. mit Gallensäure ist Fettsäure diffusibel, mit Saponin dagegen nicht. Hieraus ergibt sich klar, dass eine Löslichkeitserhöhung der Fettsäuren durch Gallensäure die Ursache der Diffusibilität der Fettsäuren ist.

II. TEIL.

Diffusion von Farbstoffen in Gelatine.

Um die Frage weiter zu verfolgen, habe ich den Einfluss oberflächenaktiver Stoffe auf die Diffusion einer Reihe von Farbstoffen untersucht. Während, wie gesagt, bei den Fettsäuren die Gallensäure rein als Lösungsvermittler wirkt und dadurch die Fettsäuren diffusionsfähig macht, kann man bei den Farbstoffen den Einfluss oberflächenaktiver Stoffe in anderer Richtung verfolgen, da wir es hier durchwegs schon mit löslichen und diffusionsfähigen Substanzen zu tun haben.

Es sei hier nur noch auf die einleitend gemachten Bemerkungen hingewiesen, dass neben der Beeinflussung der reinen Löslichkeit noch andere Faktoren für die Diffusibilität eines Stoffes massgebend sind, z. B. Aenderung des Dispersitätsgrades, Wirkung der oberflächenaktiven Stoffe auf die Membran selbst usw.

Methodik. In Probiergläsern von gleichem Durchmesser, an deren unterem Teil ein Millimeterpapierstreifen angeklebt war, wurden 5 ccm von einer 10 %-igen Gelatinelösung gegeben. Nach Erstarren der Gelatine habe ich diese mit 3 ccm Farbstofflösung und 3 ccm der Lösung, deren Einfluss auf die Farbstoffdiffusion untersucht werden sollte, überschichtet. In den Kontrollversuchen wurden statt dieser letzteren Lösungen Natriumchlorid 0,9 % bzw. Phosphatpuffer von ph 6,97 zugegeben. Die Diffusion geschah bei Zimmertemperatur. Nach Ablauf des Versuches wurde die in das Gelatinegel diffundierte Farbstoffschicht in mm abgelesen. Es wurden immer drei Parallelversuche angestellt, die auf 0,5 mm übereinstimmten. Die Farbstofflösungen waren 0,2 %-ig. Von Fluorescein wurde eine Konzentration angewandt, wie sie in einer gesättigten wässrigen Lösung vorliegt. Der wasserunlösliche Farbstoff Sudan wurde in Alkohol und Alizarin in Natrionlauge gelöst. Die Konzentration des Natriumglykocholats war 5 %-ig, des Saponins 0,4 %-ig; beide waren in einem Phosphatpuffer von pH 6,97 gelöst.

Die Versuche sind in Tabelle IV., V., VI. zusammengestellt.

Tabelle IV.

Diffusionsbeeinflussung von Alizarin, Nilblausulfat, Sudan, Trypanblau und Wasserblau.

Versuch Nr.	Versuchsdauer h	FARBSTOFF	diffundiert in mm mit 5 % Na-Glykocholat ph 6,97	0,4 % Saponin ph 6,97	Phosphatpuffer ph 6,97	0,9 % Na Cl.
9	168	Alizarin	12,2	—	7,5	7,5
11	72	Alizarin	12,5	10,5	10,5	—
10	96	Nilblausulfat	11,0	9,0	9,0	—
9a	168	Sudan	5,0	0,0	0	—
11a	72	Sudan	3,0	—	0	0
10a	95	Trypanblau	8,0	6,7	6,7	6,7
9b	168	Wasserblau	13,0	4,7	—	4,7
11b	72	Wasserblau	7,0	3,0	3,0	—

Tabelle V.

Diffusion von Eosin, Erythrosin, Fuchsin und Safranin.

Versuch Nr.	Versuchsdauer h	FARBSTOFF	diffundiert in mm mit 5 % Na-Glykocholat ph 6,976	0,4 % Saponin ph 6,976	Phosphatpuffer ph 6,976	0,9 % Na Cl.
12	96	Eosin	17,0	17,0	17,0	—
12a	96	Erythrosin	15,0	15,0	15,0	—
12b	96	Fuchsin	24,0	24,0	24,0	—
10b	96	Safranin	18,5	18,2	18,0	—

Tabelle VI.

Diffusionsbeeinflussung von Fluorescein, Kresylviolett und Methylviolett.

Versuch Nr.	Versuchsdauer h	FARBSTOFF	diffundiert in mm mit 5 % Na-Glykocholat ph 6,976	0,4 % Saponin ph. 6.976	Phosphatpuffer ph 9.676	0,9 % Na Cl.
12c	96	Fluorescein	7,0	13,75	14,0	—
9c	168	Kresylviolett	11,7	20,0	20,0	—
12d	96	Kresylviolett	10,0	17,0	18,0	—
10c	168	Methylviolett	13,0	—	27,0	27,0
11c	72	Methylviolett	11,0	13,0	13,5	—
12e	96	Methylviolett	12,25	16,75	16,75	—

1. Wirkung auf die Diffusibilität.

Die Ergebnisse sind kurz zusammengefasst die folgenden: *Saponin* zeigt keinen Einfluss auf die Diffusion der untersuchten Farbstoffe in Gelatine. Die Diffusionsschicht war in diesen Versuchen immer gleich der der Kontrollversuche. Der Einfluss von *Natriumglykocholat* ist bei den verschiednen Farbstoffen ungleich. Wir können diesbezüglich die hier untersuchten Farbstoffe in 3 Gruppen einteilen. Bei den in Tabelle 4 erwähnten Farbstoffen hat Natriumglykocholat eine *beschleunigende* Wirkung auf die Diffusion. Die in Tabelle 5 aufgeführten Farbstoffe zeigen keine Beeinflussung, während die in Tabelle 6 zusammengestellten Farbstoffe eine Diffusionshemmung erfahren.

2. Wirkung der H·-Konzentration.

Es fragt sich nun, wie diese verschiedenartigen Wirkungen des Natriumglykocholates auf die Farbstoffdiffusion zu erklären sind. Man muss vor allem an pH-Wirkungen, besonders auch an eine Aenderung der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Farbstoffteilchen und Gelatinemembran denken, da gerade Farbstoffe eine Stoffklasse sind, die in ihren Lösungen durch Aenderung der Wasserstoffionenkonzentration oder anderer Faktoren vielfach die Erscheinungen der Umladung bzw. Herabsetzung der elektrischen Ladung zeigen. Ebenso haben wir in der Gelatine ein Membranmaterial vor uns, das in charakteristischer Weise Beeinflussbarkeit der elektrischen Ladung zeigt. Je nachdem, ob sich die Gelatine in einem Milieu befindet, dessen Wasserstoffionenkonzentration im sauren oder im alkalischen Gebiet vom isoelektrischen Punkt der Gelatine liegt, zeigt diese eine verschiedene elektrische Ladung. H· bzw. OH' beeinflussen in ausgesprochenem Masse die Quellung der Gelatine. Um diese Möglichkeiten auszuschliessen, habe ich mit der oben genannten Methode Farbstoffe bei verschiedenem pH diffundieren lassen, und zwar so, dass ich die Gelatine in einer Zitratpuffermischung von pH 2.79 und von pH 6.67 gelöst habe. Die Tabelle 7 zeigt die diesbezüglichen Resultate.

Tabelle VII.

Diffusion von Alizarin, Kresylviolett, Methylviolett und Wasserblau bei verschiedenem ph in Citratpuffer.

Versuch Nr.	Versuchs dauer h	FARBSTOFF	diffundiert in mm. bei ph 2.97	bei p. 4 7	bei ph 6.67
13a	70	Alizarin	6.0	6,0	6,0
13b	70	Kresylviolett	12.7	13,0	13,0
13c	70	Methylviolett	12.0	12,0	11,75
13d	70	Wasserblau	2.5	1,5	1,75

Es ergibt sich, dass der pH- Wert ohne wesentlichen Einfluss auf die Diffusion dieser Farbstoffe ist, d. h. die Diffusionshemmung und — beschleunigung der Farbstoffe durch Natriumglykocholat ist nicht vom pH der Lösung bedingt.

3. Spektroskopischer Nachweis von Komplexbildungen.

Es lag mir nun weiterhin daran, zu untersuchen, ob die Gallensäuren die Eigenschaft haben, mit den Farbstoffen in chemische oder in physikalisch-chemische Wechselwirkungen zu treten und damit die hier gefundenen Diffusionserscheinungen zu erklären. Sind die Stoffe, mit welchen die Gallensäuren sich verbinden, wasserunlösliche Substanzen, wie höhere Fettsäuren oder wie bei den Farbstoffen Sudan und Alizarin, so werden dieselben wasserlöslich und dadurch diffusibel gemacht. Ist das Molekül des neuen Komplexes grösser als dasjenige des Ausgangsstoffes, so wird die Diffusion gehemmt sein und umgekehrt.

Ich habe versucht, mich über eine derartige Wechselwirkung zwischen Farbstoff und oberflächenaktiven Stoffen durch eine *spektroskopische Untersuchung* der betreffenden Lösung zu orientieren. Von vorneherein wollte ich hiermit lediglich versuchen, festzustellen, ob auch im spektroskopischen Verhalten die verschiedenen Farbstoffe nach Zusatz von oberflächenaktiven Stoffen sich unterscheiden. Die Deutung dieser Beobachtungen lasse ich offen.

Jarisch [13]) fand, dass Neutralrot, das bei einer schwachen alkalischen Reaktion (pH 6.5—8) einen Umschlag in gelb gibt,

nach Zusatz von Seifenlösung, die selbst schwach alkalisch ist, den erwarteten Umschlag nicht gibt. Er schliesst daraus auf eine Komplexbildung zwischen Fettsäure und Neutralrot.

Die Farbstoffspektrenuntersuchungen habe ich mit dem Handspektroskop von F. Schmidt und Haensch und mit dem Zeiss'schen Gitterspektroskop durchgeführt. Die Verdünnungen der Farbstoffösungen wurden aus den gesättigten Farbstoffösungen hergestellt. Zu den für die spektroskopischen Untersuchungen geeigneten verdünnten Farbstoffösungen wurden 3 ccm Natriumglykocholat bzw. Saponin hinzugesetzt.

Die spektroskopischen Beobachtungen ergaben das folgende:

Safranin, Trypanblau, Nilblausulfat, Wasserblau, Erythrosin, Eosin und Fuchsin zeigten weder nach Zusatz von Saponin, noch nach Zusatz von Na-Glykocholat zu ihren Lösungen eine Aenderung ihrer spektralen Eigenschaften.

Kresylviolett, Methylviolett und Fluorescein dagegen ergaben gegenüber den reinen Lösungen ein deutlich anderes Spektrum bei Zusatz von Na-Glykocholat. Saponin war auch hier ohne Einfluss, ebenso wie der Zusatz anderer Elektrolyte (Phosphatpuffer, ph 6.97, dann NaOH, HCl, NaCl und Na-Acetat.) Die beobachteten Aenderungen der spektralen Erscheinungen bei diesen letzten Farbstoffen gebe ich in der untenstehenden Abbildung 1, 2 und 3 schematisch wieder.

Spectrum von Kresylviolett (1 ccm: 100 ccm)

mit Na- Glykocholat
mit H_2O und anderen Kontrollflüssigkeiten

Abb I.

Spectrum von Metylviolett (1 ccm: 250 ccm)

mit Na- Glykocholat
mit H_2O und anderen Kontrollflüssigkeiten

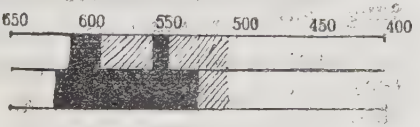

Abb II.

Spectrum von Fluorescein (1 ccm: 1 ccm)

mit Na- Glykocholat
mit H_2O und anderen Kontrollflüssigkeiten

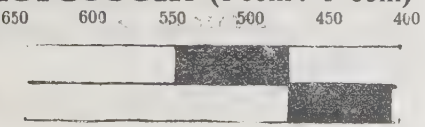

Abb III.

Diese zuletzt aufgeführten Farbstoffe, die eine Aenderung der spektralen Eigenschaften nach Na-Glykocholat Zusatz zeigen, bilden diejenige Farbstoffgruppe, die in meinen Versuchen durch die Gallensäuren eine Diffusionshemmung erfuhr.

Im Anschluss an die spektroskopischen Befunde liegt es nahe, diese beobachtete Diffusionshemmung auf eine Aenderung des Farbstoffmoleküls durch die Gallensäuren, sei es infolge einer echten chemischen Verbindung, oder einer durch Nebenvalenzen zustandekommenden Komplexbildung bzw Anlagerungsbildung zwischen Farbstoff und Gallensäure zu erklären. Wir haben in den Farbstoffen vielfach Substanzen vor uns mit einem äusserst labilen Molekül, d. h. das Farbstoffmolekül kann schon durch geringfügige Milieuänderungen eine intramolekulare Umlagerung erfahren, wie das unter anderem bei der bekannten Erscheinung der Ionisationsisomerie vermutlich der Fall ist (vergl. *Michaelis* und *Rona*). Auch dadurch könnte beispielsweise der elektrische Ladungssinn der Farbstoffe geändert sein. Wie gesagt, lassen wir diese Frage offen. Jedenfalls finden wir eine Parallelität zwischen dem Einfluss der Gallensäuren auf die Farbstoffdiffusion und der Aenderung der spektralen Eigenschaften einiger Farbstoffe.

Diskussion und Zusammenfassung.

Zusammengefasst ergeben die vorstehenden Versuche die folgenden allgemeinen Gesichtspunkte:

Bezüglich der Resorption der Fette hat sich ergeben, dass eine Beeinflussung der Diffusion von Neutralfett durch Gallensäure in Gelatine unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen nicht beobachtet werden kann.

Dagegen vermehren Gallensäuren die Löslichkeit und Diffusion von Fettsäuren in Gelatine sehr bedeutend, während das ebenfalls sehr oberflächenaktive Saponin in isokapillarer Lösung ganz unwirksam ist.

Hier bedarf es also einer chemischen Affinität zur Löslichkeitserhöhung und Diffusibilität der Fettsäuren, die mit Gallensäuren besteht, nicht aber mit dem anderen oberflächenaktiven Stoff Saponin.

Die Oberflächenaktivität als solche kann zur Erklärung der

Diffusionsbeeinflussung einer Substanz durch kapillaraktive Stoffe allein demnach nicht genügen. Meine Versuche haben einerseits gezeigt, dass Gallensäure die Diffusion mancher Stoffe zu fördern vermag, während das gleichfalls kapillaraktive Saponin hier ohne Wirkung war.

Andererseits ergibt sich sogar eine die Diffusion mancher Stoffe hemmende Wirkung durch die Gallensäure, wobei auch hier Saponin sich indifferent verhielt. Und endlich wurde in einigen Versuchen auch beobachtet, das auch die Gallensäure ohne Wirkung auf die Diffusion war.

Derartige Diffusionsbeeinflussungen wurden mit Farbstoffen ausgeführt, von welchen durch Na-Glykocholat Alizarin, Nilblausulfat, Sudan, Trypanblau und Wasserblau beschleunigt,

Eosin, Erythrosin, Fuchsin, Safranin unbeeinflusst,

Fluorescein, Kresylviolett und Methylviolett gehemmt werden

Die Diffusionsbeschleunigung bzw. - hemmung ist nicht durch den ph der Gallensäure-Lösung bedingt, ebensowenig durch eventuelle Lösungsbeeinflussungen, wie ich mich in einigen Versuchen überzeugte.

In der dritten Farbstoffgruppe, wo Diffusionshemmung eintritt lässt sich eine Aenderung des Absorptionsspektrums der Farbstoffe nach Zusatz von Na-Glykocholat nachweisen, was für eine Komplexbildung spricht.

Mithin dürfen wir wohl sagen, dass es auf die besondere chemische, bzw. physikalisch-chemische Natur der kapillaraktiven Stoffe sowohl, als auch der beeinflussten Substanzen ankommt, in welcher Weise eine Diffusionsbeeinflussung eintritt.

Wir wissen, dass gerade die Klasse der oberflächenaktiven Stoffe bei Permeabilitätsvorgängen besonders wirksam sind und müssen daher annehmen, dass die Oberflächenaktivität *eine* Bedingung für die Wirksamkeit dieser Stoffklasse ist. Aber diese Eigenschaft genügt für sich allein noch nicht.

Literatur.

1. *Freundlich, H.* und *D. Krüger*, Z. f. Elektrochemie **36**, h. 5. 1930, — 2. *Nistler*, A. Kollodchem, Beiheft. 3. *Traube*, J. Pflügers Archiv, **105**, 541, 1904. **123**, 419, 1908. — 4. *Brinkmann* und *Szentgyörgyi*, Biochem. Z. **139**, 261, 270, 1923. 5. — *Traube J.* und *Siar Hong Whong*, Biochem. Z. **203**, 363, 1928. — 6. *Weber* und *Neugebauer*, Z. f. physik. Chemie, 1928. zitiert nach Traube. — 7. *Neuberg, C.*, Biochem. Z. 76, 107, 1916. — 8. *Kochmann*, Biochem. Z. **136**, 40, 1923. *Anselmino*, Biochem Z. **192**, 390, 1928. — 9. *Küthy, A.*, Biochem. Z. **237**, 398, 1931.— 10. *Süllmann, H.* und *Schaub L* Biochem. Z. **251**, 369, 1932. — 11. *Wieland, E* und *Sorge*, Z. f. physiol. Chemie **97**, 25, 1925. — 12. *Verzár, F.* und *Küthy, A.*, Biochem. Z. **205**, 369, 1928. **210**, 295, 1929. **210**, 281, 1929. **225**, 268, 1930. **230**, 451, 1931. — 13, *Jarisch, A.*, Biochem. Z. **134**, 177, 1922. *Michaelis* und *Rona* Biochem. Z. 23, 61, 1910.

Curriculum vitae.

Ich, Ladislaus Laszt, habe die vorliegende Arbeit unter der geschätzten Leitung von Herrn Professor Dr. F. Verzár, an der Universität Basel ausgeführt. Ich bin am 6. November 1908 in Grosswardein (Ungarn), (jetzt Oradea, Rumänien) geboren.

Ich besuchte die dortige ungarische Elementarschule und Oberrealschule und beendete im Jahre 1926 meine Mittelschulausbildung im dortigen rumänischen Gymnasium. Im Jahre 1928 machte ich in Budapest die ungarische Maturitätsprüfung. Meine ersten drei medizinischen Semester studierte ich in Hamburg bei den Herren Professoren Poll, Brodersen, Winkler, Koch und Blotevogel. 1930 kam ich nach Basel um mein medizinisches Studium fortzusetzen, wo ich besonderes Gewicht auf die theoretische Ausbildung im physiologischen Institut von Herrn Professor Dr. F. Verzár gelegt habe. Ausserdem besuchte ich die Vorlesungen und praktischen Uebungen von den Herren Professoren Verzár, Ludwig, Spiro und Fichter. Im Winter-Semester 1930/31 habe ich meine vorklinischen Examen bei den Herren Professoren Verzár, Ludwig und Spiro abgelegt. Meine klinische Ausbildung genoss ich bei den Herren Professoren Gerlach, Doerr, R. Staehelin, Gigon, Labhardt, Jaquet, Henschen, Suter, Brückner, Wieland, Lutz, J. Staehelin, Hagenbach, Staub, Iselin und Schönberg.

Allen diesen Herren möchte ich für meine Ausbildung bestens danken.

Herrn Professor F. Verzár bin ich für meine physiologische Ausbildung zu besonders grossem Dank verpflichtet.